



**ATTI X CONGRESSO NAZIONALE  
SO.F.I.VET.**

**Taormina (Messina), 8 – 9 luglio 2013**

## **SOCIETA' ITALIANA DI FISIOLOGIA VETERINARIA**

### **Consiglio Direttivo**

Prof. Mario Baratta (Presidente)  
Prof. Salvatore Naitana (Vice-Presidente)  
Prof. Maria Giovanna Galeati (Componente)  
Prof. Ester Fazio (Tesoriere)  
Dott. Vincenzo Mastellone (Segretario)

### **Comitato Scientifico**

Prof. Adriana Ferlazzo  
Prof. Gianfranco Gabai  
Prof. Giovanna Galeati

### **Comitato Organizzatore locale**

Prof. Adriana Ferlazzo  
Prof. Ester Fazio  
Dott. Pietro Medica  
Dott. Cristina Cravana

Con il Patrocinio di:

Università degli Studi di Messina  
Dipartimento di Scienze Veterinarie

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia  
"A. Mirri"

Ditta Novartis Animal Health SpA



## IDENTIFICAZIONE DI PRODOTTI ITTICI MEDIANTE DNA BARCODING

### FISH IDENTIFICATION BY DNA BARCODING

M.L. Puglisi<sup>°</sup>, S. Reale\*, R. Giunta\*, A. Salamanca\*, F. Vitale\*, M. Cosenza\*, T. Alfonzetti<sup>°</sup>

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, <sup>°</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie - Fisiologia Veterinaria, Biochimica Veterinaria - Università di Messina.

**Parole chiave:** Barcoding, Pesce.

**ABSTRACT** – The authors developed and evaluated DNA barcodes for use in differentiating domestic and imported fish species (1). First, we sequenced part of the cytochrome oxidase I (COI) gene in accordance with standard DNA barcoding protocols. These alignments allowed the development and analyses of consensus barcode sequences for each species and comparison with limited sequences in public databases (GenBank and Barcode of Life Data Systems). In this study, we report test regarding Mediterranean fish identifications. Experimental validation parameters were obtained on certain specie-specific DNA and sensitivity, specificity, reproducibility, concordance tests role out value as 100%, 100%, 99%, 99.8% respectively. The advantage of using “COI” gene is that it is short enough to be sequenced quickly and cheaply yet long enough to identify variations among species, and enabling identifications where traditional methods are not “applicable, such as for immature stages or body fragments (2). FISH-BOL will also provide a powerful tool for enhanced understanding of the natural history and ecological interactions of fish species.

**INTRODUZIONE** – Il DNA Barcoding è una tecnica nata da un'iniziativa di Paul D.N. Hebert dell'Università di Guelph (Canada), che sfrutta la variabilità di un marcatore molecolare per l'identificazione di identità biologiche (1). Questa tecnica si basa sul presupposto che ogni specie possiede un unico codice identificativo di DNA, che metaforicamente viene paragonato ai codici a barre lineari o "UPC" (*Universal Product Code*) presenti nei vari prodotti commerciali. Gli strumenti classici utilizzati in tassonomia, basati sulle differenze morfologiche degli esemplari, possono essere potenziati dall'uso di questa nuova tecnica molecolare (<http://www.barcoding.si.edu>)(3).

La corretta identificazione delle specie ittiche presenti in commercio risulta necessaria infatti per il rispetto della legislazione sull'etichettatura del pescato e sulla tracciabilità della filiera. Il DNA barcoding rappresenta un'etichetta indelebile e inalterabile. Inoltre può risultare utile per le rilevazioni di eventuali frodi commerciali da sostituzione di specie, per individuare specie potenzialmente tossiche od allergeniche, o provenienti da areali inquinati o non controllati o per la presenza di biotossine termoresistenti. Gioca pure un ruolo di interesse, in ambito ecologico-legale, per la tutela di specie protette ed per il rispetto del fermo biologico, permettendo così il monitoraggio e la conservazione della biodiversità su ampia scala attraverso la determinazione della vasta ricchezza di specie presenti.

Il target molecolare utilizzato per tale metodica è il DNA mitocondriale ed in particolare il gene che codifica per la sub-unità del citocromo ossidasi b (Cyt B), che viene generalmente considerato il “DNA Barcode” di elezione per le specie ittiche, in quanto presenta un'alta identità intraspecifica e una bassa identità interspecifica.

La citocromo ossidasi è una proteina trans membrana mitocondriale che gioca un ruolo fondamentale nella fosforilazione ossidativa e mostra un alto grado di conservazione tra le specie, rispetto a quella osservata tra specie differenti. Inserzioni e delezioni in tale regione sono rare. In ambito biochimico e fisiologico, l'applicazione del DNA Barcoding potrebbe avere utilità legata alla caratterizzazione della citocromo ossidasi, in quanto poi, eventuali deviazioni dai valori attesi, potrebbero essere legati a potenziali alterazioni delle capacità metaboliche.

**MATERIALI E METODI** – In questo lavoro viene descritto il metodo del DNA Barcoding utilizzato dagli autori per la caratterizzazione di specie di pesci. Il metodo è stato prima validato su 100 esemplari ittici caratterizzati e certificati a priori per la costruzione di una banca dati di sequenze genetiche, e poi impiegato sul campo per l'identificazione di prodotti da banco.

Il metodo prevede l'applicazione delle seguenti fasi:

1. Estrazione del DNA mediante fenolo-cloroformio e quantizzazione per via spettrofotometrica;
2. Amplificazione del gene per la Cyt b mediante PCR usando il kit Life Technology Taq gold così costituito: Buffer 1X, 2 mM di  $MgCl_2$ , 0.4 mM di dNTP, 0.6 pmol/ $\mu l$  del primer forward Cyt-1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e del primer reverse Cyt-2 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') (4) (5), 0.03 U/ $\mu l$  di Ampli TAQ Gold DNA Polimerasi e il DNA, in un volume finale di 50  $\mu l$ . Il profilo termico usato è il seguente: 10 min a 94°C, 40 cicli di 50 sec a 94°C, 50 sec a 53°C e 1 min a 72°C, e una polimerizzazione finale di 7 min a 72°C. Nella reazione di PCR sono stati inclusi un controllo negativo e uno positivo di specie nota;
3. Gel d'agarosio al 2%, per verificare la giusta dimensione delle bande (655bp);
4. Purificazione successiva degli amplificati e verifica a seguito di corsa elettroforetica. I prodotti di PCR purificati si avviano alla reazione di sequenza, usando la versione 1.1 del kit big dye terminator (Life Technology). I prodotti di PCR di sequenza si purificano nuovamente e si sottopongono all'analisi del sequenziatore automatico "Abi Prism3130 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems);
5. Analisi degli elettroferogrammi mediante "Sequencing Analysis 5.2" e allineamento delle sequenze usando il software Wu-Blast.

**RISULTATI** – In questo lavoro è stata descritta la metodica di determinazione dell'identità genetica di specie ittiche attraverso il sequenziamento di un gene target specifico (Cytb). La ripetibilità e la riproducibilità sono state testate mediante saggi su standard di riferimento. L'identificazione della specie d'appartenenza di ciascun campione in analisi è raggiunta mediante l'ausilio di software specifici come Wu-Blast e Mega 5 che permettono il confronto tra le sequenze per la ricerca del grado di omologia con quelle di riferimento, raccolte in GeneBank. Ai fini dell'attribuzione di specie si è considerata significativo un grado di omologia genetica in un intervallo di confidenza del 97%. Questo valore di accettabilità, fortemente stringente, è comunque, in tutti i casi esaminati, servito a confermare, l'identificazione morfologica, eseguita in prima istanza per l'attribuzione del corrispondente nome scientifico. Preliminarmente il risultato della sperimentazione è dato dalla validazione del metodo basata sulla misurazione di parametri di qualità. I dati ottenuti hanno così permesso l'attribuzione del 100% per la sensibilità e specificità, del 99.6% per la ripetibilità, del 99.8% per la concordanza tra diverse sedute analitiche e nel complesso di 100 unità campionarie certificate. Tali parametri sono stati tutti attentamente registrati ai fini della standardizzazione del metodo. Solo successivamente si è poi passati all'applicazione su campioni ittici in commercio.

**CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI** – Il DNA Barcoding costituisce un valido strumento per affiancare gli studi di classificazione tassonomica, ostacolare i fenomeni di caccia illecita, la pesca ed il

commercio illegale, l'utilizzo di errata e fraudolenta etichettatura, la sostituzione di specie di notevole valore commerciale con altre di minore pregio, la commercializzazione di prodotti provenienti da zone diverse da quanto indicato in etichetta.

La rapidità di esecuzione e la specificità del metodo e la possibilità di automazione della tecnica sono elementi atti a valorizzare l'uso del DNA Barcoding. Inoltre mentre l'identificazione morfologica va condotta da personale esperto conoscitore dei vari parametri identificativi, e delle misure anatomiche necessarie, l'indagine molecolare fornisce un risultato oggettivo, basato semplicemente sulla evidenza scientifica della sequenza di un target ormai universalmente riconosciuto sufficiente ai fini della definizione del fingerprinting molecolare.

**BIBLIOGRAFIA** – 1) Hebert PD et al. (2003) *Proc Biol Sci*; 270: 313-321. 2) Shneer V.S. (2009) *Zh Obshch Biologii*; 70 (4): 296-315. 3) Ward RD, FISH-BOL, (2012) *Methods Mol Biol*; 858: 423-439 4) Hold GL. et al. (2001) *J Agric Food Chem. Mar*; 49(3):1175-9. 5) Robert D Ward et al. (2005) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 October 29; 360(1462): 1847–1857. Published online 2005 September 15.